

エンドトキシンのラット肝ミトコンドリアに 及ぼす影響についての研究

I. 分離肝ミトコンドリアに及ぼすエンドトキシンの 影響およびエンドトキシンショック時の 肝ミトコンドリア機能について

鍋田 光一 小西 裕蔵

札幌医科大学外科学第1講座 (主任 早坂 滉教授)

Effects of *E. coli* Endotoxin on Rat Liver Mitochondria

I. The Effects of *E. coli* Endotoxin on Isolated Rat Liver Mitochondria and Rat Liver Mitochondrial Functions Following Endotoxin Administration

Koichi NABETA and Yuzo KONISHI

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Hasasaka)

The effects of *E. coli* endotoxin (Et) on isolated rat liver mitochondria and rat liver mitochondrial functions after Et shock were studied.

The results were as follows.

1) Interaction of Et with intact mitochondria resulted in a loss of respiratory control ratio (RCR), decrease of ADP/O ratio and phosphorylative activity, together with an increase of ATPase activity and induction of mitochondrial swelling. A small dose of Et increased the succinate-cytochrome c reductase activity, whereas a large dose inhibited the activity. The content of respiratory enzymes was not influenced by Et.

2) During the 2 hours after administration of lethal Et (5 mg/100 g), RCR, ADP/O ratio and phosphorylative activity were unchanged, however, they decreased rapidly after 3 hours. The succinate-cytochrome c reductase activity, the ATPase activity and the content of respiratory enzymes were not influenced throughout the course of the experiments.

3) The inhibition of mitochondrial respiration by Et was not seen in the experiments on liver slices *in vitro*.

From these results, it may be considered that the cause of the liver mitochondrial dysfunctions after the administration of Et was to be sought in tissue hypoxia due to changes in the circulatory system rather than a direct effect of Et on mitochondrial membranes.

(Received August 13, 1980 and accepted August 25, 1980)

1 緒 言

エンドトキシンは1933年 Boivin によって細菌の細胞壁から抽出された Phospholipid-polysaccharide protein complex で¹⁾, それを生体に投与すると, 特異的なショック状態に陥り死亡する^{2~4)}. この病態像が septic shock のそれと類似しており, また精製エンドトキシンが開発され, 容易に入手できるようになったことなどから, 近年エンドトキシンショックは septic shock のモデルとして種々の

方面から多くの研究がなされてきている. エンドトキシンショックに際して障害される臓器は全身におよび, その中でも肝臓はエンドトキシンの target organ の1つであるといわれ, radioisotope を利用した報告^{5~7)} や蛍光抗体法を用いた検索結果^{8,9)} からも投与されたエンドトキシンは主として肝臓や脾臓など網内系組織に分布しているとの報告が多い. 特にショックと肝障害との間には強い関連性があり, エンドトキシンショック時の肝の形態的变化^{10~12)} や生化学的研究^{13~16)} についても多くの報告がなされている.

最近, ショックにおける病態像を subcellular level から検討する報告が多くなってきており, 特にミトコンドリアは細胞の呼吸やエネルギー産生の場として重要な機能を営むと同時にそれを触媒する複合酵素系が複雑な構造を形成しているところから, ショックにおけるミトコンドリアの研究はその細胞の根本的な viability を知るだけでなく, 生体膜の一つのモデルとしてショック時の細胞の機能および形態変化を知る上で有意義な手段と考えられる。一方, エンドトキシンショックにおいてこのような細胞および組織障害がエンドトキシン (以下 Et と略す) の直接作用なのかあるいは他のショックと同様に全身循環不全にもとづく組織 hypoxia による二次的な変化なのかは不明である。それは Et 自体が極めて多彩な生物活性を示すとともに, 動物の種の差による target organ の相異, さらに生体内では網内系, 免疫系, 神経系および内分泌系などが関与し, ショックの病態像を複雑に修飾するためと考えられる。本研究において著者らはまずこのような種々の修飾因子を除去した条件下でエネルギー産生系への影響を調べるために, ラット分離肝ミトコンドリアについて特に電子伝達系を中心に検討し, 次に生体に致死量の Et を投与し, Et 血症時の肝ミトコンドリア機能変化について検討した。

2 実験方法

2.1 実験 I: 分離肝ミトコンドリアに対する Et の影響

2.1.1 肝ミトコンドリアの調整

Wistar-King 系ラット (150-180 g ♂) を一昼夜絶食し, 断頭脱血後, 生理食塩液 20 ml で門脈より肝灌流を行ない, 4 g の肝組織を氷冷した 0.25 M sucrose medium (0.25 M sucrose, 0.2 mM EDTA, 0.01 M tris-HCl pH 7.4) 中にて細切し, 小田の方法¹⁷⁾ に準じ肝ミトコンドリアを調整した。なお, 電子顕微鏡にてこのミトコンドリア分画にはごく少量のマイクロゾームおよびライソゾームの混入をみとめた。なお, Et は *E. coli* 026: B6 Difco Labo. を注射用蒸留水に溶解し用いた。また蛋白量は Lowry 法¹⁸⁾ により測定した。

2.1.2 ミトコンドリア呼吸能および酸化的リン酸化の測定

ミトコンドリアは 0.25 M sucrose, 0.2 mM EDTA, 0.01 M tris-HCl (pH 7.4) buffer にて約 12 mg/ml の suspension とし, その 150 μ l を使用した。反応液は萩原の方法¹⁹⁾ に準じ, 0.25 M sucrose, 0.01 M KH_2PO_4 , 0.2 mM EDTA, 0.01 M KCl, 0.002 M MgCl_2 , 0.01 M tris-HCl (pH 7.4) を用い, 総量 2 ml として, 25°C で閉鎖型酸素電極装置 (ユニオン技研) を用い, 0.2 M succinate 5 μ l を基質とし測定した。なお, ADP はベーリンガー社製品を用い, 光学

法にて検定した。また, Et と肝ミトコンドリアは 25°C で 3 分間 preincubation を行なった。

2.1.3 呼吸鎖成分量の測定

萩原の方法²⁰⁾ に準じ, 0.25 M sucrose, 0.02 M phosphate buffer (pH 7.4) にミトコンドリアを分散し (約 3~4 mg/ml), Et とは 25°C 3 分間 incubation 後, 二波長二光束分光光度計 (島津 UV-300) を用い, 下記の波長での O.D. を測定し, それぞれの吸光係数から各成分量を計算した。測定波長は cytochrome aa₃: 605-630 nm, cytochrome b: 562-575 nm, cytochrome c+c₁: 550-540, FPD: 465-500 (以下 cytochrome を cyt. と略す) 吸光係数は cyt. aa₃: 16.5, cyt. b: 17.9, cyt. c+c₁: 19.0, FPD: 11.0 を用いた。なお, 基質として 2 mM succinate+0.2 mM glutamate を用い, 一方のセルには 5 μ M rotenone を添加した。

2.1.4 呼吸鎖成分の還元率測定

樋口・村岡の方法²¹⁾ に準じ, 0.05 M sucrose, 0.01 M KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 0.015 M KCl, 0.025 M tris-HCl (pH 7.4) の反応液にミトコンドリアを分散 (約 2~3 mg/ml) し, 25°C で 3 分間 O₂ 95%, CO₂ 5% の混合ガスで飽和させながら preincubation を行ない (Et との反応時間も同様), succinate を基質とし, 分光光度計 (島津 UV-300) を用い, 2 波長法で室温にて測定を行なった。なお, 測定波長は cyt. aa: 605-630 nm, cyt. b: 430-410 nm, cyt. c+c₁: 550-540 nm, FPD: 465-510 nm を用いた。

2.1.5 Succinate-cytochrome c reductase 活性値の測定

0.25 M sucrose (pH 7.4) で約 0.6-0.8 mg/ml のミトコンドリア suspension を作製し, succinate+2 cytochrome c³⁺→fumarate+2 cytochrome c²⁺ の反応系を用いた King の方法²²⁾ に準じ 0.2 M phosphate buffer, 3 mM EDTA, 0.6 M succinate, 1 mM cytochrome c, 1 mM KCN (pH 7.4) の反応液中にて, 室温で分光光度計 (島津 UV-300) を用い, 550 nm の波長にて室温で経時的に O.D. を測定した。なお, ミトコンドリアと Et は 25°C 3 分間の incubation をおこない, ミトコンドリアは 0.12-0.16 mg protein を使用した。また, acceptor としての cytochrome c specific activity は下記の式より算出した。

$$\text{specific activity (cyt. c as acceptor)} = \frac{\Delta A_{550}}{W \times 12.8}$$

ΔA_{550} : 1 分間当りの O.D., W: ミトコンドリア蛋白量, さらにこの実験で用いた CoQ₁₀ はユビキノロン (エーザイ) を使用した。

2.1.6 肝ミトコンドリア ATPase の測定

0.25 M sucrose (pH 7.4) でミトコンドリア suspension (1-2 mg/ml) とし、終濃度 0.2-0.3 mg ミトコンドリア蛋白/ml を用い、教室の上村らと同様²³⁾に、66 mM NaCl, 33 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 25 mM tris-HCl (pH 7.4) の反応液中で 5 mM ATP を添加して 37°C で 10 分間反応させ、氷冷した 10% TCA を加えて反応を止め、直ちに産生した Pi 量を Fiske-Subbarow 法²⁴⁾により測定した。またミトコンドリアと Et は 25°C で 3 分間の pre-incubation を行なった。

2.1.7 ミトコンドリアの形態的变化

Lehninger *et al.* の方法²⁵⁾に準じ、分離肝ミトコンドリアを EDTA を含まない氷冷した 0.25 M sucrose で 3 回洗浄し、0.25 M sucrose (pH 7.4) で約 5 mg/ml の suspension とした。反応液は 0.3 M sucrose, 0.02 M tris-HCl (pH 7.4) buffer を用い、総量 5 ml とした。Mitochondria suspension を 0.2 ml を加えた時点で反応を開始、10 分毎に 50 分間、分光光度計 (島津 UV-300) を用い、520 nm の波長でミトコンドリアの透過光の変化を測定した。なお、Et はあらかじめ反応液に添加しておき、反応は 20°C で行なった。

2.2 実験 II: 実験的エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能変化

2.2.1 Et の投与方法および肝ミトコンドリア分離法

Et およびラットは実験 I と同一種類のものを使用し、Et は生理食塩水にて 10 mg/ml に溶解し使用した。エーテル麻酔下にラット尾静脈より Et 5 mg/100 g を投与後、1 時間毎に 5-6 匹ずつ屠殺脱血後、直ちに肝臓 4 g を取り出し、氷冷した 0.25 M sucrose buffer 中にて細切後、肝ミトコンドリアを調整した。また対照群として Et を含まない同量の生食水を投与し、同様に経時的にミトコンドリアを調整した。

2.2.2 血圧測定

ネムブタール麻酔下に腹部大動脈にカテーテルを挿入し、圧トランスデューサー TM-1 (日本光電) および多用途監視装置 (日本光電 RM-100 型) を用い、動脈圧を測定記録した。

2.2.3 肝ミトコンドリア呼吸能およびリン酸化能、呼吸鎖成分量, succinate-cytochrome c reductase および ATPase 活性は実験 I と同様の方法で測定した。

2.3 実験 III: 肝 slice における incubation 実験

ラットを屠殺脱血後、氷冷した Ca^{++} free の Lock's solution (pH 7.4) を用い²⁶⁾、門脈より肝灌流を行ない 4 g の肝臓を剔出し、YS-Slicer (堀田理化) にて 0.4 mm の厚さに細切後、10% 牛血清アルブミンを含む Ca^{++} free

の Lock's solution 100 ml を入れた 200 ml 用三角フラスコ内で肝 slice を O_2 95%, CO_2 5% の混合ガスで満しながら 25°C で incubation を行なった。Et は 10 mg を添加した。10, 20, 30 分間の incubation 後、氷冷した incubation medium で 2 回洗浄後、0.25 M sucrose, 0.2 mM EDTA, 10 mM tris-HCl (pH 7.4) medium を用い、homogenate をつくり、実験 I と同様にミトコンドリア分画を調整し、呼吸能およびリン酸化能を測定した。

3 実験結果

3.1 分離肝ミトコンドリアにおける Et の影響

3.1.1 ミトコンドリア呼吸能および酸化的リン酸化におよぼす影響

Fig. 1 左は正常ラット肝ミトコンドリアの polarography であるが、1.25 mM succinate を添加すると state 4 近似の呼吸状態となり、更に 125 μ M ADP を添加すると急速な呼吸促進が起こり、state 3 に導く。添加した ADP が完全に ATP に移行すると state 4 に戻る。この図より呼吸調節率 (respiratory control ratio, RCR と略す) = state 3/state 4, ADP/O 比, ミトコンドリア mg 蛋白当りのリン酸化能を測定した。これに対し (Fig. 1) 右は Et

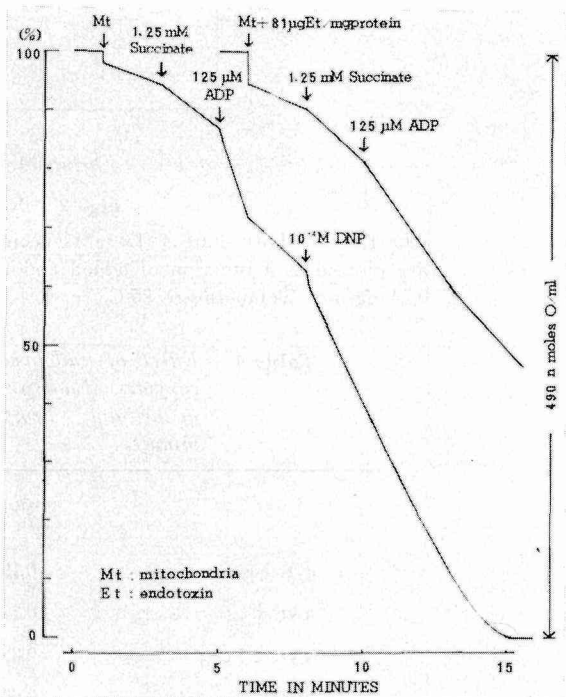


Fig. 1 Oxygen uptake rates recorded in the absence (trace on the left) and in the presence (trace on the right) of 81 μ g of endotoxin per milligram of mitochondrial protein.

を $81 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein 添加した時の polarography である。state 4 での酸素消費量は control では $12.6 \text{ n moles O}_2/\text{mg protein}/\text{min.}$ であるが、Et 添加例では増加傾向を示した。一方、state 3 については Et 添加例では control の $50.8 \text{ n moles O}_2/\text{mg protein}/\text{min.}$ よりも減少傾向を示した。これを (Fig. 2) のごとく、各種濃度について測定すると酸素消費量は state 4 では Et 添加量に比例し、Et $100 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein では $17.0 \text{ n moles}/\text{mg protein}/\text{min.}$ であった。State 3 ではこれと逆に Et 添加量に反比例する傾向がみられ、 $100 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein では 24.5 n

$\text{moles}/\text{mg protein}/\text{min.}$ と control より著明に減少した。RCR を計算してみると添加 Et 量の増加に応じて低下し、 $0.07 \text{ mg}/\text{mg}$ protein の Et 量で control の約 50% と著明な減少を示した (Fig. 3 A)。ADP/O 比も同様に添加 Et の増加に応じて、低下傾向をみとめるが、その低下率は RCR に比べ軽度であった (Fig. 3 B)。またミトコンドリア mg 蛋白当りの 1 分間のリン酸化能についてみると、添加 Et 量の増加に応じ著明な低下をみとめ、 $0.05 \text{ mg}/\text{mg}$ protein の Et 量で control の約 50% 値を示した (Fig. 3 C)。

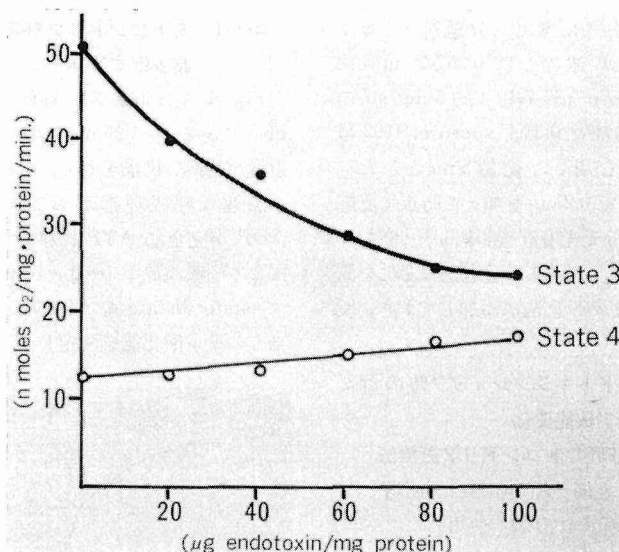


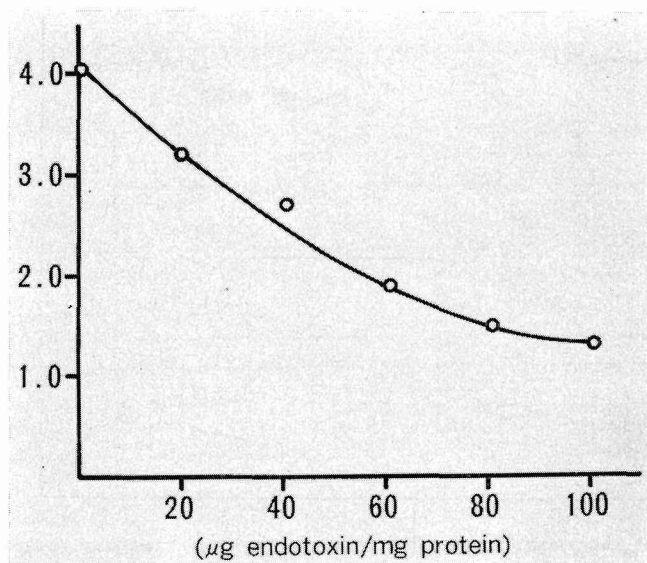
Fig. 2 Respiratory rate.

The rates of both state 4 (1.2 mM succinate) and state 3 ($+125 \mu \text{ MADP}$) respiration are plotted as a function of added endotoxin concentration. Rat mitochondria were $0.74 \text{ mg}/\text{ml}$. Temperature 25°C .

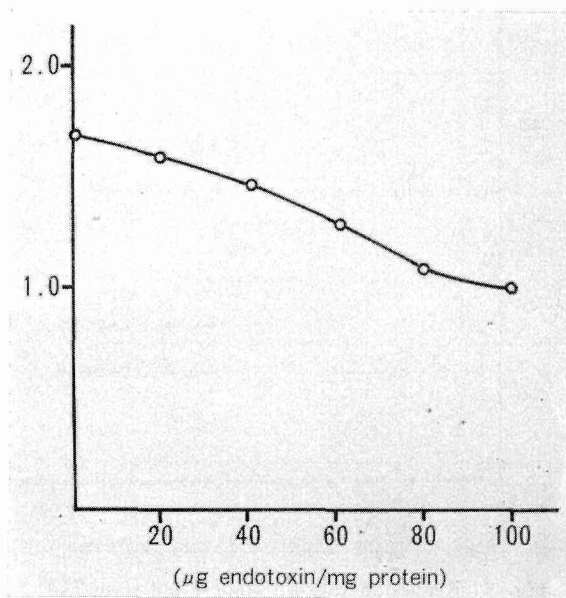
Table 1 Effect of endotoxin on the content of respiratory enzymes. Endotoxin ($0.1 \text{ mg}/\text{mg}$ protein) was added in medium. Temperature 25°C . Incubation time 3 minutes

	endotoxin (—)	endotoxin (+)
cyt. aa ₃	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02
cyt. b	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03
cyt. c+c ₁	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.03
FPD	0.65 ± 0.10	0.68 ± 0.11

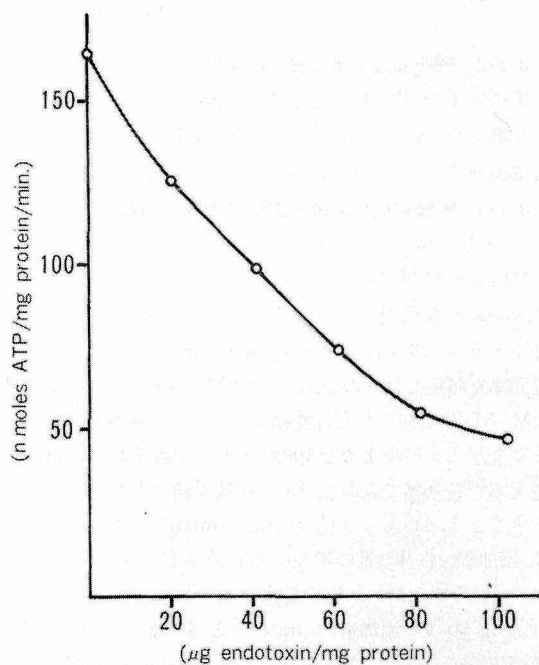
n moles/mg protein.



(A)



(B)



(C)

Fig. 3 Effect of endotoxin on respiratory control ratio (A), ADP/O ratio (B) and phosphorylative activity (C) in rat liver mitochondria. O_2 uptake was measured in mitochondrial suspension at 0.74 mg protein/ml with 1.2 mM succinate and presence of added ADP (125 μM).

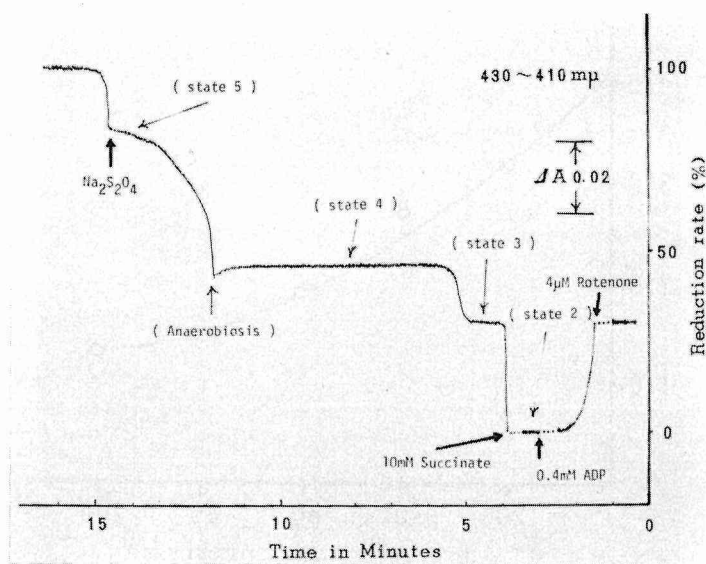


Fig. 4 Redox changes on various states of cytochrome b in a suspension of intact rat liver mitochondria.

Rat mitochondria were 2.87 mg/ml. Temperature 25°C.

3・1・2 呼吸鎖成分量におよぼす影響

Table 1 は Et 非添加群と 0.1 mg/mg protein の Et 添加群とを比較したものであるが、各呼吸鎖成分における量の差はみとめられなかった。

3・1・3 呼吸鎖成分の還元率におよぼす影響

cytochrome aa₃, cytochrome b, cytochrome c+c₁, FPD はほぼ同様の傾向を示したので、ここでは特に cytochrome b を代表として検討した。Fig. 4 は正常ラット肝ミトコンドリアにおける cytochrome b の各 state の還元率を測定したものである。4 μM rotenone 添加後 0.4 mM ADP を加えた完全酸化レベルから Na₂S₂O₄ を加えた完全還元レベルまでを 100% とし、それぞれの state の還元率を百分率で表現し、Et の影響を検討した。Fig. 5 に示すごとく、state 4 の還元率は control で 48% であり、Et 添加例では Et 量の増加に応じ減少傾向を示すのに対し、state 3 ではほとんど変化をみとめず、約 230 μg/mg protein の Et 添加量で state 4 と state 3 の還元率が同じ値を示した。一方、基質として succinate を添加してから anaerobiosis までに到る時間をみると control の 9 分 15 秒を 100% とすると添加 Et 量の増加に応じ短縮をみとめた (Fig. 6)。脱共役剤の 1 つである 2×10⁻⁵ M の pentachlorophenol (PCP) を Et の代りに添加すると、total reduction rate および state 3 の還元率に変化はみられず、state 4 の還元率のみが 32% と著明な減少をみとめ anaerobiosis に到るまでの時間も短縮し、Et 添加群

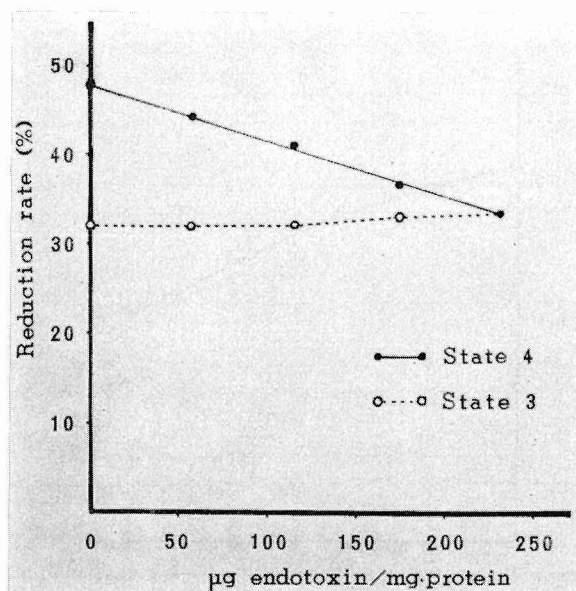


Fig. 5 Reduction rate on state 4 and state 3 of cytochrome b by succinate as a function of added endotoxin concentration.

Rat mitochondria were 2.87 mg/ml. Temperature 25°C.

と同様の傾向を示した。一方、電子伝達遮断剤であるマロン酸 (10⁻⁴ M) の添加では state 3 および state 4 両方の還元率の著明な減少がみられ Et とは逆に anaerobiosis

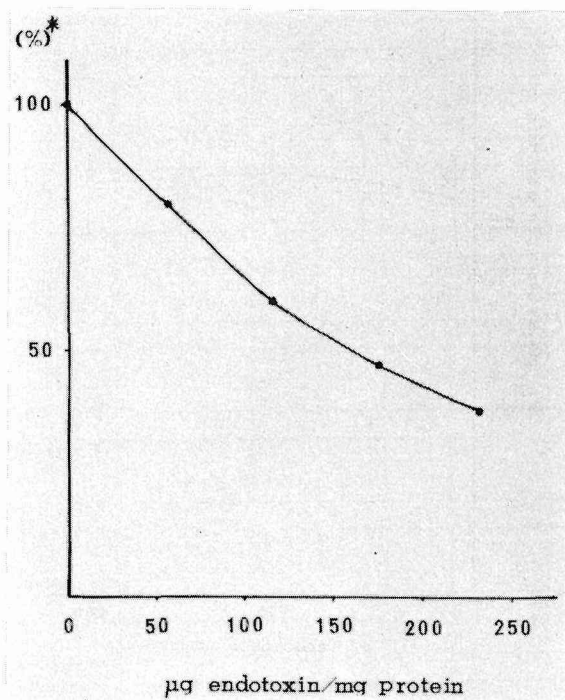


Fig. 6 The time up to anaerobiosis after the addition of succinate.

The reduction of cytochrome b upon an addition of 10 mM succinate was measured as shown in Fig. 5.

$$* \left(\frac{\text{Reduction time after endotoxin treatment}}{\text{Reduction time before endotoxin treatment}} \times 100 \right)$$

に到るまでの時間の著明な延長がみとめられた。

3.1.4 Succinate-cytochrome c reductase におよぼす影響

無傷ミトコンドリアの succinate-cytochrome c reductase の specific activity は $0.154 \mu \text{ moles/mg protein/min.}$ であり、これは $0.1 \text{ mg/mg protein}$ までの範囲では添加 Et 量に応じ増加傾向を示し、 $0.1 \text{ mg/mg protein}$ 以上では一定値を示した。しかし、 $0.4 \text{ mg/mg protein}$ 以上の大量の Et 添加で逆に抑制されることがみとめられた (Fig. 7)。またこの大量の Et 量添加による specific activity の抑制は CoQ_{10} 5 mg を加えることにより阻止された (Fig. 7 中の破線)。

3.1.5 ATPase におよぼす影響

ラット肝ミトコンドリアの total ATPase 活性は 0.5 mM NaN_3 により 90% 以上抑制された。無傷ミトコンドリアの ATPase 活性は $0.063 \pm 0.012 \mu \text{ moles Pi/mg protein/min.}$ と低い、添加 Et 量の増加に応じて上昇をみとめ、 $50 \mu \text{g/ml}$ の Et 量で $0.149 \pm 0.009 \mu \text{ moles Pi/mg protein/min.}$ と有意の増加をみとめた (Fig. 8 A)。

一方、無傷ミトコンドリアに $1.25 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2, 4-dinitrophenol (DNP) を添加すると ATPase は $0.214 \pm 0.023 \mu \text{ moles Pi/mg protein/min.}$ と高値を示し、DNP にさらに Et を添加してももはや ATPase 活性上昇に有意差をみとめなかった (Fig. 8 B)。

3.1.6 ミトコンドリアの形態変化におよぼす影響

Et 添加量が 0.1 mg/5 ml では spontaneous swelling と透過度にはほとんど差はみとめられなかったが、 0.2 mg/5 ml

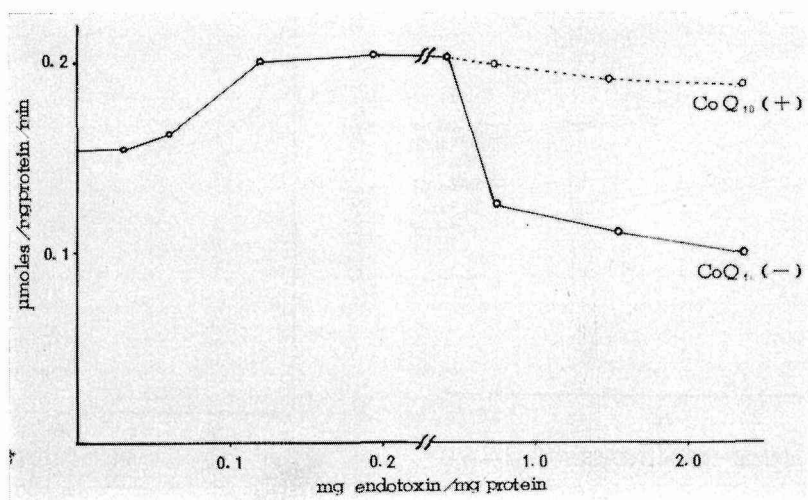


Fig. 7 Specific activity (cytochrome c as acceptor) of succinate cytochrome c reductase.

Rat mitochondria were $0.6\text{--}0.8 \text{ mg/ml}$. Temperature 25°C .

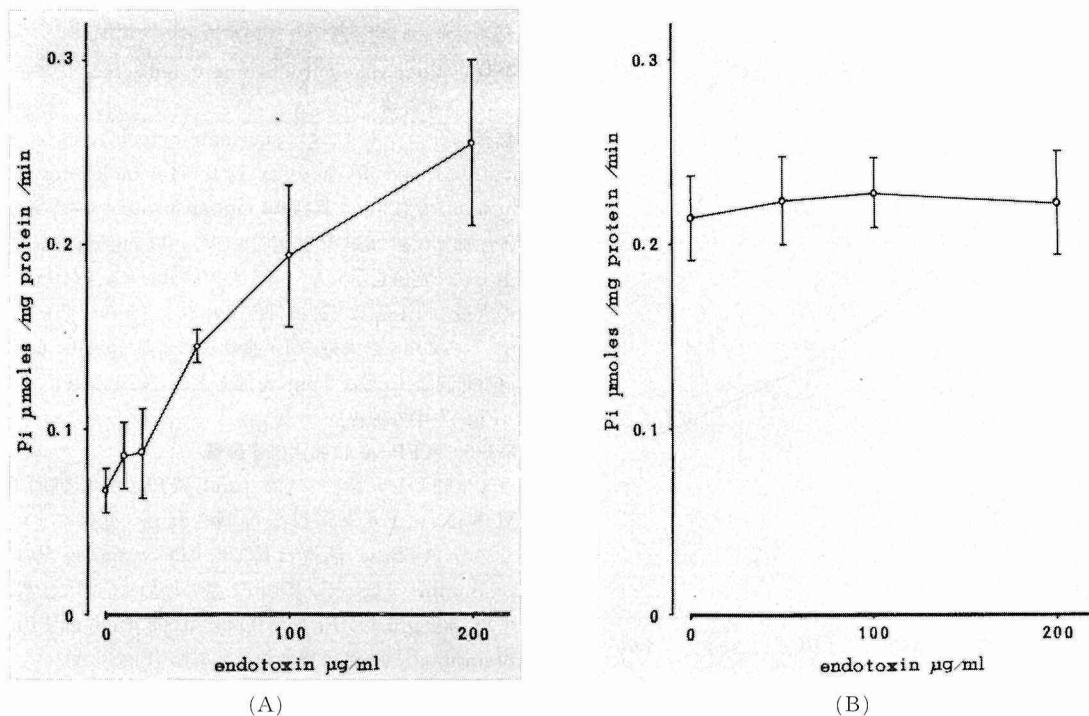


Fig. 8 ATPase activity

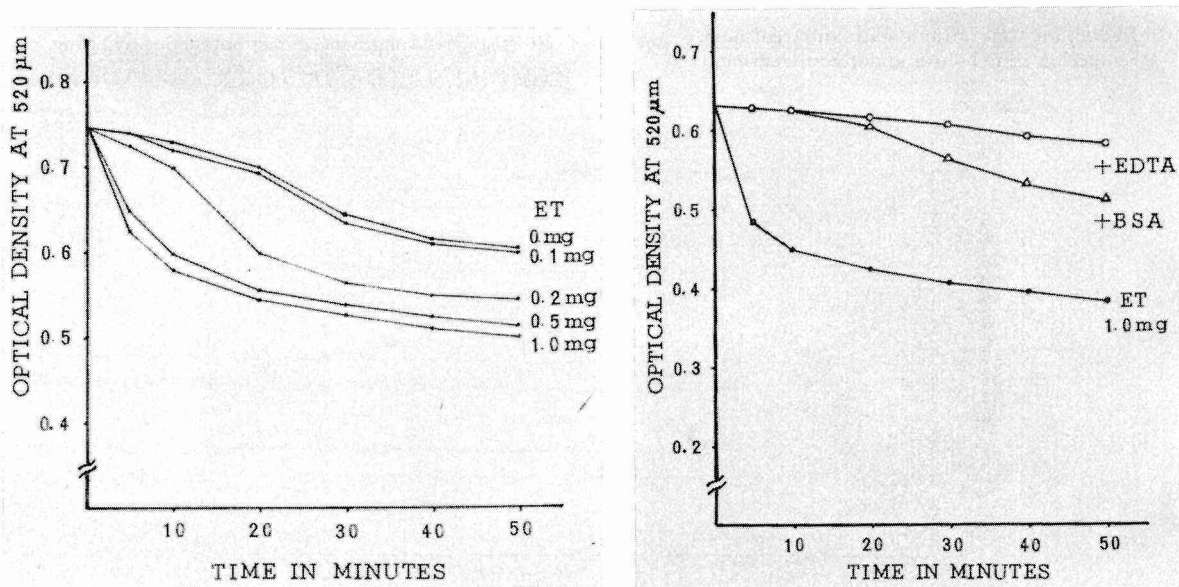
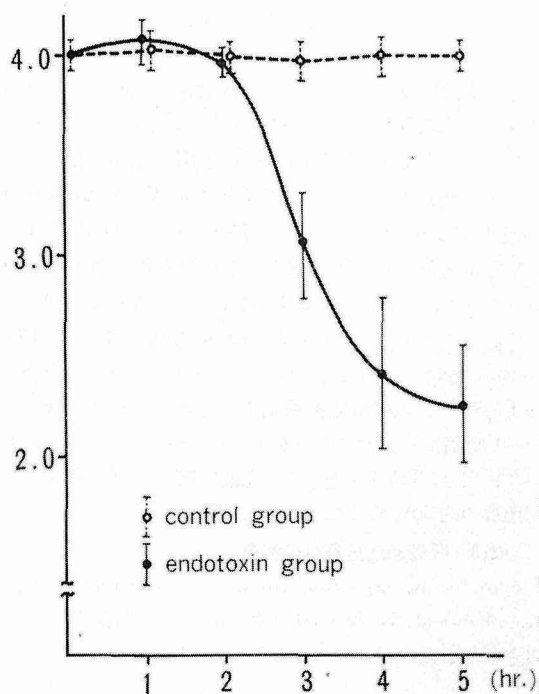
(A) DNP (-) (B) 1.25×10^{-5} M DNP was added.Activity expressed as μ moles Pi/mg Mt Protein/min. at 37°C
Mitochondrial concentration was 0.2–0.3 mg/ml.

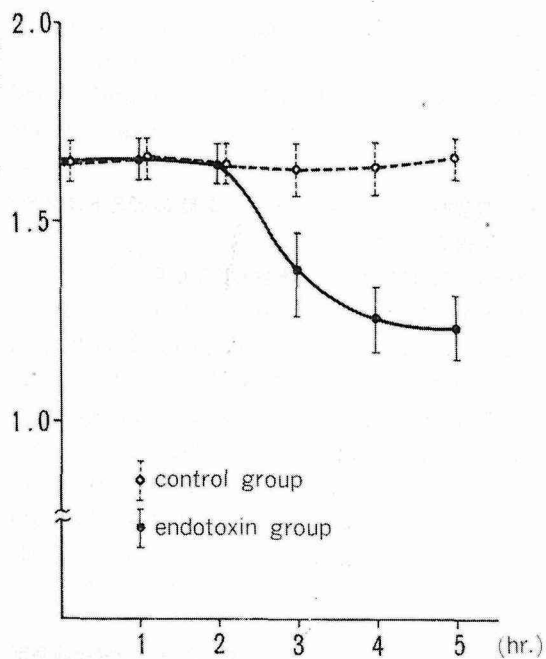
Fig. 9. Endotoxin-induced swelling

- (A) Effect of various concentration of endotoxin on the swelling of rat liver mitochondria.
 (B) Effect of EDTA and BSA on endotoxin-induced swelling. (Endotoxin was added at 1 mg/5 mL, EDTA at 2 mM, and BSA at 3 mg/mL). Standard test system of 5.0 mL, 0.3 M sucrose 0.02 M tris-HCl (pH 7.4) at 20°C .



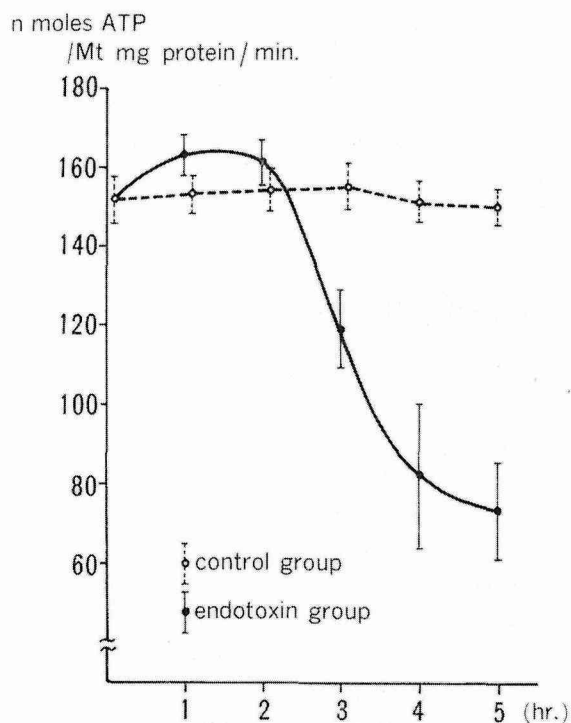
endotoxin 5mg/100 g i.v.

(A)



endotoxin 5mg/100 g i.v.

(B)



endotoxin 5mg/100 g i.v.

(C)

Fig. 10 Effect of endotoxin shock on (A) RCR, (B) ADP/O ratio and (C) phosphorylative activity in rat liver mitochondria.

O_2 uptake is shown in Fig. 3.

以上になると Et 量の増加に応じ 10 分以内に急激な swelling が発生し、それ以後の変化は軽度であった (Fig. 9 A). また、この Et 添加によってひきおこされるミトコンドリア swelling は 2 mM EDTA および 3 mg/ml の BSA (牛血清アルブミン, キンダ化学) によって抑制された (Fig. 9 B).

3・2 実験的エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能

3・2・1 Et 投与後のラット生態観察所見

Et 5 mg/100 g をラット尾静脈から投与しても投与後 1 時間位までは特に著変をみとめず、投与直後の血圧変化もみとめられなかった。1 時間を過ぎる頃から毛が逆立ち、目は輝き、外部からの刺激に対し過敏となる。その後、ラットの動きは緩慢となり、下痢や血便をみとめるようになる。投与 3 時間後には外界からの刺激に対し、反応しなくなり、ラットは死亡しはじめる。この時期つまり死亡直前になってはじめて、有意の血圧低下がみられた。また開腹所見では投与 3 時間を過ぎると肝臓のうっ血、腸管の出血、浮腫が著明にみとめられた。

3・2・2 肝ミトコンドリア呼吸能およびリン酸化能測定

Table 2 Effect of endotoxin shock on the content of respiratory enzymes

		cyt aa ₃	cyt b	cyt c+c ₁	FPD
Before endotoxin administration		0.23±0.02	0.16±0.02	0.35±0.03	0.92±0.11
After endotoxin administration					
30 min	control group	0.21±0.03	0.17±0.04	0.31±0.04	0.98±0.16
	endotoxin group	0.21±0.02	0.15±0.03	0.33±0.03	0.96±0.09
180~240 min	control group	0.22±0.04	0.16±0.04	0.36±0.04	0.96±0.08
	endotoxin group	0.20±0.03	0.13±0.04	0.32±0.05	0.95±0.09

n moles/mg protein.

3・2・4 Succinate-cytochrome c reductase への影響

死亡直前では 0.135 ± 0.021 とやや specific activity の低下をみとめるが、対照群 0.157 ± 0.011 と比べ有意差はみられなかった。(μ moles/mg protein/min.)

3・2・5 ATPase 活性におよぼす影響

Et 投与後 3~4 時間を経過しても 0.082 ± 0.021 と対照群 0.066 ± 0.018 に比べ有意の上昇はみとめられず、また DNP induced ATPase 活性は対照群 0.221 ± 0.023 , Et 群 0.227 ± 0.023 と差はみとめられなかった。(μ moles Pi/mg protein/min.)

3.3 肝 slice におよぼす Et の影響

対照群では RCR, ADP/O 比, 単位 mg 蛋白当りの ATP 産生能は incubation time が長くなるにつれてやや低下傾向を示すが、30 分以内の incubation 実験では対照群と

Et 投与群において state 4 では時間の経過とともに呼吸の亢進傾向をみとめるが有意差はみとめられなかった。一方、3 時間以降の state 3 の抑制は著明であった。RCR は 30 分~1 時間目にかけてやや亢進傾向を示すが有意差はなく、3 時間を過ぎる頃になると急速に著明な低下を示したが、前述の *in vitro* 実験における 100 μ g Et 添加時の低下率より大ではなかった (Fig. 10 A). ADP/O 比も 3 時間を過ぎると急速に低下するが、RCR に比して低下率は小さく、また *in vitro* 実験に比べても RCR と同じく死亡直前でも 1.23 ± 0.08 と低下傾向が軽度であった (Fig. 10 B). 実験 I と同じようにミトコンドリア mg 蛋白当りの 1 分間のリン酸化能を検討してみると Et 投与後、30 分~1 時間に一過性の上昇をみとめたが 2 時間でもとのレベルに戻り、3 時間を過ぎると急速に低下し、死亡直前では対照群の約 50% 近くに低下した (Fig. 10 C).

3・2・3 呼吸鎖成分量への影響

cytochrome aa₃, cytochrome b, cytochrome c+c₁ および FAD は、Et 投与 30 分後および 3~4 時間後でも Et 投与前値と差はみとめられなかった (Table 2).

Et 添加群との間で有意差はみとめられなかった (Fig. 11 A, B, C).

4 考 察

細胞は生存するための化学反応を維持するため、エネルギーを産生する。グルコース代謝はいくつかの過程に沿ってエネルギーを産生することができる。グルコースは嫌気状態下では乳酸や他の糖分画まで分解され、好気状態下では H₂O や CO₂ まで分解される。グルコースが摂取されなければ ATP 合成のために同様な炭水化物を得る必要がある。その代償機構として gluconeogenesis が存在し、アミノ酸、脂肪酸やグリセロールからグルコースを産生する。ショック時には嫌氣的 glycolytic cycle のみ維持され、グルコース代謝はピルビン酸→acetyl CoA までで停止し、

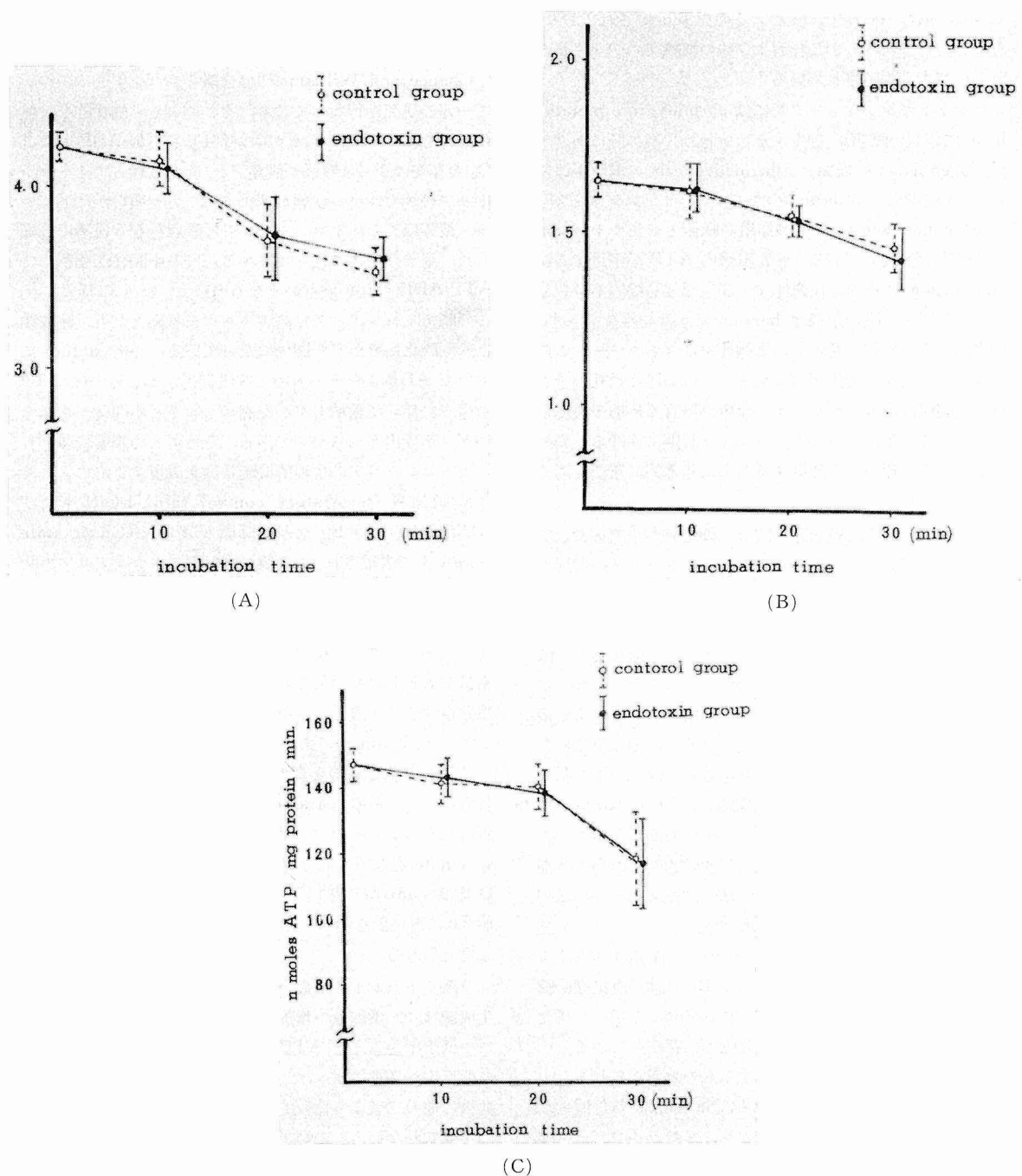


Fig. 11 Effect of endotoxin on (A) RCR, (B) ADP/O ratio and (C) phosphorylative activity in the experiments on liver slices. 0.4 mm liver slices 4 g and endotoxin 10 mg were added in medium. 25°C.

ピルビン酸は TCA cycle へ入るのを block されており、乳酸の方へ進む¹⁴⁾。また肝および他の組織での ATP 量の著しい減少も報告されている^{27,28)}。

エンドトキシンショック時には carbohydrate metabolism に著しい障害が発生するといわれ、特に肝における glycogenolysis の増加と gluconeogenesis の減少が報告されている^{29,30)}。Filkins¹⁵⁾ はエンドトキシンショック時の gluconeogenesis の抑制作用の原因としてミトコンドリア障害を示唆している。また組織内 ATP が不足すると vital organ に重篤な代謝性および生理学的機能不全をひきおこし^{14,31)}、膜の透過性 barrier はもはや維持できず、細胞内イオン変化が発生し、細胞死をひきおこす³²⁾。このようにエネルギー産生障害はショックにおける致死因子と重要な関係にあり、エネルギー産生小器官の形態や機能変化について正確に知ることはショック状態における特異的細胞変化や代謝不全を理解するために基本的に重要と考えられる。

近年、ショック時の病態に関して細胞レベルで綿密な解析がなされており、ショック時のミトコンドリアの形態および機能変化についての報告が多くなってきている。それによるとエンドトキシンショック時には肝ミトコンドリアは腫脹し、マトリックスは破壊され^{11,12,33)}、酸化的リン酸化の障害がひきおこされるといわれている^{34,35)}。しかしながら、このような肝ミトコンドリア障害が Et による直接作用によってひきおこされるのか、あるいは循環不全のための組織 hypoxia による二次的な変化なのか、いまだ明らかでない。Harken *et al.*³⁶⁾ は細胞膜は Et の barrier とはなりえないと述べ、ミトコンドリアへの直接作用を主張しており、De Palma *et al.*³⁷⁾ は形態学的変化の発生時期の検討から、さらに Rangel *et al.*³⁸⁾、Schumer *et al.*³⁹⁾ は Et がライソゾームの labilizer であり、ライソゾーム酵素を遊離させ、これがミトコンドリアに作用するという直接作用説を強調している。また、Et 自体が直接細胞膜に影響を与えるという報告^{40~42)} や isotope を用いた研究で標識 Et が肝ミトコンドリア分画中に存在しているという報告^{5,43)} も直接作用説を支持するものと考えられる。一方 anoxia は肝細胞の pH の低下、Na⁺ 増加、K⁺ 減少など陽イオン濃度の変化をひきおこし、またライソゾーム膜の維持に必要な ATP レベルを減少させることによってライソゾーム酵素の遊離を招来し、これがミトコンドリア障害の原因となるという二次的障害説を支持する報告も多い^{12,14,44)}。

本研究ではまず、*in vitro* において、Et が分離肝ミトコンドリアに対し、どのような影響をおよぼすかについて知るとともに、Et を生体内に投与した時の肝ミトコンドリア

機能について検討し、さらに細胞膜を通して Et がミトコンドリアに作用するか否かについて肝 slice 実験を試みた。

Chance and Williams⁴⁵⁾ は分離ミトコンドリアについて一連の研究を行っており、それによると酸化的リン酸化を行なうミトコンドリアでは呼吸基質、Pi、ADP および O₂ の存在によって呼吸が調整され、それに伴ってミトコンドリアのエネルギー状態が変化することを明らかにしている。彼等はこのミトコンドリアの呼吸状態を5段階に分類した。基質の酸化に伴って高エネルギー中間体が蓄積して ATP/ADP の比が最も高くなるのは state 4 の時であり、この時ミトコンドリアは高エネルギー状態となり、呼吸鎖とリン酸化系とが平衡関係になっている。一方 state 3 において ADP が加えられると呼吸促進がおこるのは ATP の生成に伴って蓄積していた高エネルギー中間体からエネルギーが放出されるためである。そこでこの調整代謝されたミトコンドリアの生理的機能状態を表現するものとして呼吸調節率 (respiratory control ratio, RCR) および ADP/O 比 (P/O 比) などの指標がある。RCR は state 3/state 4 で表現され、この値が高い程ミトコンドリアの共役能が強く、酸化的リン酸化能も高く、ミトコンドリアの障害の程度を示す重要な指標となっている。一方、ADP/O 比は添加された ADP が ATP へのリン酸化に要する酸素量を表わしたものでこの値は呼吸基質の違いによって当然共役するリン酸化の部位の数も異なる。この値はミトコンドリアが intact であれば理論値に見合うが、ミトコンドリアが傷害されると真の P/O 比より小さい値となる。著者らはこれらの parameter の他にミトコンドリア mg 蛋白当りの1分間の ATP 生成能を測定した。著者らの succinate を基質とした実験結果を検討してみると、ADP/O 比は control で約 1.7 であり、succinate 基質での理論値 2.0 に近い値を示し、比較的 intact に分離されていると考えられる。

分離ミトコンドリアの RCR, ADP/O 比および ATP 生成能は Et 添加量の増加に応じ減少傾向を示した。またこの低下率をみると ATP 生成能, RCR, ADP/O 比の順に低下率が著明であった。このことは ADP/O 比つまり共役は他の二者より比較的安定であることを示唆しているのかも知れない。この結果は Boime *et al.*⁴⁶⁾ の ischemic rat liver の研究結果とも一致している。state 4 呼吸は Et 添加により亢進し、いわゆる uncoupling 様作用がみとめられる。しかしながら、state 4 呼吸の増加率に比べ、state 3 呼吸の減少率の方が大きく、RCR の減少は主として state 3 呼吸の抑制がその原因と考えられる。

次に電子伝達系について検討してみると、Et は succinate-stimulated oxidation には影響を与えないとい

う報告⁴⁸⁾や逆に succinate oxidation を障害するとの報告^{35,36)}もあるが, Et の電子伝達系におよぼす影響について詳述した報告は少なく, 未だ一致した見解はない. まず, 呼吸鎖成分量であるが Et 大量添加しても量的変化はみとめなかった. つまり, 呼吸鎖成分はミトコンドリアの内膜にきっちりと組み込まれており, そのために比較的安定に保たれている可能性が高い.

Mela *et al.*⁴⁷⁾ は succinate 基質による呼吸鎖成分の還元障害を報告しており, 添加 Et 量の増加に比例して還元時間の延長もみとめている. 著者らは樋口・村岡の方法²¹⁾に準じ, cytochrome b を用い, 各 state 毎の還元率を検討した. Fig. 5 から明らかなように state 4 での還元率のみが著明に障害されており, また Fig. 6 からこの時の呼吸促進が明らかであることから, この還元率の障害は Mela *et al.*⁴⁷⁾ が主張する succinate oxidation の障害ではないことが想像できる. そこで原因を検討するために, 脱共役剤の1つである pentachlorophenol (PCP) と電子伝達遮断剤であるマロン酸を用いた. PCP 添加では Et と同じように state 4 の還元率の減少と anaerobiosis 迄の時間の短縮をみとめた. 一方マロン酸添加では state 3 および state 4 両方ともに還元率の著明な減少と anaerobiosis 迄の時間の延長をみとめた. この結果からも Et による呼吸鎖成分の還元率の減少は脱共役剤に似た作用であって succinate oxidation あるいは電子伝達系への障害作用でないことが明らかである.

著者らはさらに詳しく Et の電子伝達系への影響を知るために succinate-cytochrome c reductase について検討を加えた. Fig. 7 のように succinate cytochrome c reductase specific activity は Et が 0.1 mg/mg protein 以下では上昇傾向を示す. この結果は polarography と同じように state 4 の呼吸亢進を裏付けており, Mela *et al.* の主張する電子伝達系への抑制作用あるいは succinate の利用障害はみとめないものと思われる. 一方, 0.4 mg/mg protein 以上の大量の Et が添加された場合には逆に specific activity の抑制作用が出現するのが認められた. しかしながら, その抑制率はせいぜい対照群の約 30% 程度であった. さらにこの specific activity の抑制は CoQ₁₀ の添加により著明に改善された. この結果から, 大量の Et やあるいは少量の Et でも長時間ミトコンドリアに作用した場合, CoQ₁₀ の部で電子伝達系を障害する可能性を示唆しているものと考えられる.

次に ATPase についてみると, Mela *et al.*⁴⁷⁾ は脱共役剤である FCCP (carbonylcyanide-p-trifluoro-methoxyphenylhydrazine) によって induce された ATPase 活性が Et によって抑制されると報告しており, Laveine *et*

*al.*⁴⁹⁾ は ATPase 活性は Et 添加により増加するが, DNP あるいは DNP+Mg²⁺ で induce された A₁Pase 活性は Et 添加により逆に抑制されると述べている. 著者らの実験成績ではラット肝ミトコンドリアの ATPase 活性は Et 添加により明らかに上昇し, Et 濃度に依存性であった. 一方, DNP を添加し induce した ATPase 活性は Et を添加しても変化をみとめなかった. このことは Et と DNP などの脱共役剤は同じ作用機序をもつものと思われる. ATPase はミトコンドリアの内表面に結合している F₁-particle に限局しているといわれ⁵⁰⁾, De Palma *et al.*³⁷⁾ は ATPase 活性の増加は F₁-particle の露出か F₁-particle の medium 中への遊離を示唆していると報告していることから, Et や脱共役剤は直接この部に作用している可能性もある.

次に著者らは Et によるミトコンドリアの形態的变化を検討するために分光光度計によるミトコンドリアの透過性変化の測定を行なった. この方法はミトコンドリアの微小な変化をみることはできないが, 大きな形態変化を測定するには簡単な方法であり, 古くからミトコンドリアの mechanochemical 反応の解析に役立てられている⁵¹⁾. この方法にもとづいて検討してみると Et 添加量の増加に応じてミトコンドリアの swelling をひきおこすことが判明した. これはエンドトキシンショック時のミトコンドリアの電顕所見^{11,33)}, および分離ミトコンドリアに直接 Et を添加した時のミトコンドリアの電顕所見⁵²⁾と一致する. その作用機序について検討してみると, 一般に DNP, dicumarol, PCP などの脱共役剤は spontaneous swelling を阻止するといわれており^{25,51)} Et はこれらの脱共役剤とはミトコンドリアの形態に対し, 異なる作用をもつ可能性が示唆された. 一方, この Et によるミトコンドリア swelling が EDTA によって著明に阻止された. これは EDTA が 2 価イオンをキレートする作用というよりは pyridine nucleotides の leakage を阻止するという報告が多く^{53,54)} Et が pyridine nucleotides の部に作用している可能性がある. また BSA によりこの swelling をある程度阻止できることから, Ca²⁺, thyroxine などの脱共役作用をもつものと似た作用機序が考えられ^{55,56)}, Et は Lehninger and Remmert のいう U-factor のような fatty acid を形成し, この fatty acid かあるいは Et の fatty acid の部分がミトコンドリア膜に変化をおよぼしている可能性も考えられる. このミトコンドリアの形態変化と機能障害との関連性について検討した報告⁵⁷⁾もあるが今回の著者らの実験においては EDTA を加えミトコンドリアの swelling を阻止した条件下でも先に述べたようにミトコンドリアの呼吸能, リン酸化の障害が発生することから, このミトコ

ンドリア形態と機能との間に相関はみられなかった。なお、ミトコンドリアの微小変化とその機能状態を検討するにはこの方法では不可能であり、90°光散乱測定法を用い、同時に機能を測定する必要がある、現在検討中である。以上が分離肝ミトコンドリアにおよぼす Et の直接作用について検討した結果であるが、著者らの用いたミトコンドリア分画中には少量のライソゾームも含まれており、上記の Et のミトコンドリアへの作用がライソゾーム酵素を介して発現している可能性も否定できない。

次に生体投与実験について検討してみると、犬や家兎の実験例では Et 投与直後に急激な血圧低下をみとめるという報告が多い^{58,59)}。これは投与された Et が流血中に入ると血小板、血管内皮細胞、RES などに取り込まれ、血管作動物質（ヒスタミン、セロトニン、キニン類、カテコールアミンなど）を放出し、末梢循環不全をひきおこし、血液の pooling が起き、血圧低下をひきおこすと考えられている⁶⁰⁾。一方、ラットではこのような Et 投与直後の著明な血圧低下はみられないといわれており^{61,62)}、著者らの実験からも同様に Et 投与直後にはみられず、死亡直前になってはじめて血圧低下をみとめた。これは種属の差により、血管系の Et に対する感受性に差があることを示唆している。肝ミトコンドリア機能をみると RCR は3時間を過ぎると急速に低下をみとめる。これは state 4 の呼吸亢進というより state 3 呼吸の抑制のためであった。ミトコンドリア mg 蛋白当りの1分間の ATP 生成能をみると Et 投与後1時間前後に一時上昇をみとめた。これは Et 投与直後に発生した一過性の肝循環不全による代償性機能亢進とも考えられる。3時間を過ぎると同様に急激な減少をみとめた。ADP/O 比もやはり3時間を過ぎてから低下をみとめるが、分離肝ミトコンドリア実験の時と同じように RCR や ATP 生成能の変化に比べ、その低下率は小さい。これら RCR, ADP/O 比および ATP 生成能にみられる肝ミトコンドリア機能障害は肝臓のうっ血や消化器の出血浮腫が著明となり全身循環不全が発生し、死亡直前になってから急激に発生するように思われた。

一方、呼吸鎖成分および電子伝達酵素系にほとんど変化がみられないのは、これらがミトコンドリアの内膜にきっちりと組み込まれており、外からの変化に対し比較的安定なのかも知れない。また、ATPase も分離肝ミトコンドリアにおける Et 添加実験と異なり、死亡直前でも ATPase 活性の増加はみとめられず、また Lavine *et al.*⁴⁹⁾ が報告しているような DNP-induced ATPase 活性の抑制もみとめられなかった。このように生体系と分離肝ミトコンドリア実験において、呼吸能やリン酸化能では同じような傾向を示したが、ATPase 活性においては両者に相違があり、

生体ではさらに別の機序が関与している可能性も否定できない。以上のように *in vitro* の実験における分離肝ミトコンドリア研究から、Et は細胞膜やミトコンドリア膜に対し、直接あるいはライソゾームを介して影響をおよぼすことが明らかとなったが、一方生体系の実験においては、Et 投与から肝ミトコンドリア機能障害発生までの時間の大幅な遅れ、および *in vitro* と *in vivo* における ATPase 活性の違いなどから、エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能障害は Et による直接作用とは考えにくい、そこで次に著者らは Et が肝細胞膜を通して直接ミトコンドリアに影響をおよぼすか否かについて検討するために肝 slice を用いて Et との incubation 実験を行なったところ、少なくとも短時間内ではミトコンドリア機能障害は発生せず、生体系において、Et が肝ミトコンドリアに対し、直接影響をおよぼさないことが示唆された。したがってエンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能障害発生の原因はなにかということになるが、現時点ではなお不明である。著者らはこの原因の可能性として、現在、全身循環不全あるいは肝循環不全にもとづく肝組織の hypoxia の可能性も考えており、現在その原因の究明等について検討中である。一方、hypoxia や anoxia がどのような機序によりミトコンドリア機能障害をひき起こすのかは現在なお明らかではないが、組織 anoxia が発生すると細胞内の pH 低下などによりライソゾーム膜が脆弱となり、ライソゾーム酵素が遊離され、これがミトコンドリア障害をひき起こす可能性も考えられる。逆に anoxia により、ミトコンドリアの ATP 合成能が低下し、細胞内 ATP 量の減少によりライソゾーム膜の安定性が維持できず、ライソゾーム酵素が遊離され、さらにミトコンドリアを irreversible な変化へと導く可能性も否定できない。最近、平田・金子⁶³⁾ は Et 投与時の肝細胞性のライソゾーム酵素の上昇が anoxia に起因していると報告しており、肝組織の anoxia が重要な役割りを果していることを強調している。しかし、組織 anoxia 単独ではミトコンドリア機能障害は発生せず、Et などのショックにより membrane toxin が生成され、これがミトコンドリアや細胞膜に影響をおよぼすという報告⁶⁴⁾ もみられ、この機序の解明にもさらに今後の研究が待たれる。

5 結 語

ラット肝ミトコンドリアに対するエンドトキシンの影響およびエンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能に関する実験を行ないつぎの結果を得た。

1) 分離肝ミトコンドリアに直接エンドトキシンを添加すると、RCR, ADP/O 比およびミトコンドリア単位蛋白

当りの ATP 生成能は低下し、呼吸鎖成分の還元率は state 4 の還元率のみ抑制され、ATPase 活性は上昇し、ミトコンドリア swelling も発生した。Succinate-cytochrome c reductase activity はエンドトキシンが少量では上昇するが大量では逆に抑制された。一方、呼吸鎖成分量には変化をみとめなかった。

2) 致死量のエンドトキシンを静注すると、RCR, ADP/O 比および ATP 産生能は2時間迄はあまり変化をみとめないが、3時間を過ぎラットが死亡しはじめる頃になると急激に低下した。一方、succinate-cytochrome c reductase activity, ATPase および呼吸鎖成分量には有意の変化をみとめなかった。

3) 肝スライスを用いた *in vitro* 実験では、エンドトキシンによる肝ミトコンドリア機能変化はみとめられなかった。

以上の結果より、エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能障害発生の原因はエンドトキシンの直接作用というよりは循環不全にもとづく組織 hypoxia による可能性が強く示唆された。

稿を終えるにあたり、御協力いただきました教室の上村恭一講師、山本勝裕先生、山光進先生に深く謝意を表します。

なお本論文の要旨は第 77, 78 回日本外科学会総会、第 12 回日本消化器外科学会総会で発表した。

文 献

1. 丹羽 充: 内毒素の構成と活性. 本間 遜, 斎藤和久, 河西信彦, 丹羽充編集: 細菌内毒素. 208-238, 講談社, 東京 (1973).
2. Baue, A. E.: Recent developments in the study and treatment of shock. *Surg. Gynecol. Obstet.* **127**, 849-878 (1968).
3. Fine, J.: Septic shock. *JAMA* **188**, 127-132 (1964).
4. Spink, W. W.: Endotoxin shock. *Ann. Intern. Med.* **57**, 538-552 (1962).
5. 斎藤公男, 鈴木美保子, 奥秋 晟, 斎藤 勝: ^{51}Cr -endotoxin のマウス臓器, 細胞内分布. *麻酔* **25**, 934-941 (1976).
6. Braude, A. I., Carey, F. J. and Zalesky, M.: Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal doses of *E. coli* endotoxin labelled with radioactive sodium chromate. *J. Clin. Invest.* **34**, 858-866 (1955).
7. Mayne, Y. C. and Jones, R. S.: Tissue distribution of ^{14}C -labeled bacterial polysaccharide in guinea pig, rat, mouse and rabbit. *Proc. Soc. Exp. Med.* **98**, 734-737 (1958).
8. Cremer, N. and Watson, D. W.: Influence of stress on distribution of endotoxin in RES determined by fluorescein antibody technic. *Proc. Soc. Exp. Med.* **95**, 510-513 (1957).
9. Rubenstein, H. S., Fine, J. and Goons, A. H.: Localization of endotoxin in the walls of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 458-467 (1962).
10. Levy, E., Path, F. C. and Ruebner, B. H.: Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Light microscopy and histochemistry. *Am. J. Path.* **51**, 269-285 (1967).
11. Levy, E., Path, F. C., Slusser, R. J. and Ruebner, B. H.: Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Electron microscopy. *Am. J. Path.* **52**, 477-502 (1968).
12. 平間敏憲, 小川勝洋: エンドトキシン投与時におけるラット肝病変の電子顕微鏡的研究. *札幌医誌* **46**, 425-447 (1977).
13. Rush, B. F. and Hsieh, J.: *In vivo* and *in vitro* effects of endotoxin on tissue metabolism. *Surgery* **63**, 298-300 (1968).
14. Schumer, W. and Kukral, J. C.: Metabolism of shock. *Surgery* **64**, 630-636 (1968).
15. Filkins, J. P.: Hypoglycemia and depressed hepatic gluconeogenesis during endotoxemia in lead sensitized rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **142**, 915-918 (1973).
16. Holtzman, S., Schuler, J. J., Earnest, W., Erve, P. R. and Schumer, W.: Carbohydrate metabolism in endotoxemia. *Circulatory Shock* **1**, 99-105 (1974).
17. 小田琢三: 肝, 心筋ミトコンドリアの調整. 生体膜実験法 (上) 蛋白質核酸酵素 別冊, 246-251 (1974).
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
19. 萩原文二: ミトコンドリア実験法 2. 酸素電極法による呼吸の測定. 蛋白質核酸酵素 **10**, 1689-1702 (1965).
20. 萩原文二: 差スペクトルと二波長測定 of 生体内酸化還元色素への応用. 蛋白質核酸酵素 **13**, 370-385 (1968).
21. 樋口富彦, 村岡三郎: ミトコンドリア呼吸鎖成分の分光学的解析法. 生体実験法 (下) 蛋白質核酸酵素 別冊, 5-23 (1974).
22. King, T. E.: Preparations of succinate-cytochrome c reductase and the cytochrome b-c₁, par-

- ticle, and reconstitution of succinate-cytochrome c reductase. *Methods in Enzymology* **10**, 216-225 (1967).
23. 上村恭一, 橋川征児, 山本勝裕, 戸塚守夫, 早坂 澁: ラット肝の膜 (ATPase) 系におよぼすエンドトキシンの作用. 術後代謝研究会誌 **11**, 345-348 (1976).
 24. 荒谷真平, 阿南功一, 小松茂三郎共著: 医化学実験入門. 南山堂, 東京 (1966).
 25. Lehninger, A. L., Ray, B. L. and Schneider, M.: The swelling of rat liver mitochondria by thyroxine and its reversal. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 97-108 (1959).
 26. Jacob, S. T. and Bhargava, P. M.: A new method for the preparation of liver cell suspensions. *Exp. Cell Res.* **27**, 453-467 (1962).
 27. Baue, A. E., Chaudry, I. H., Wurth, M. A. and Sayeed, M. M.: Cellular alterations with shock and ischemia. *Angiology* **25**, 31-42 (1974).
 28. Menguy, R. and Masters, Y. F.: Gastric mucosal energy metabolism and stress ulceration. *Ann. Surg.* **180**, 538-548 (1974).
 29. Mc-Callum, R. E. and Berry, L. J.: Effects of endotoxin on gluconeogenesis, glycogen synthesis, and liver glycogen synthase in mice. *Inf. Immun.* **7**, 642-654 (1973).
 30. La Noue, K. F., Mason, A. D. and Daniels, J. P.: The impairment of glucogenesis by gram negative infection. *Metabolism* **17**, 606-611 (1968).
 31. Jordan, G. L., Fischer, E. P. and Lefrak, E. A.: Glucose metabolism in traumatic shock in the human. *Ann. Surg.* **175**, 685-692 (1972).
 32. Gallagher, C. H., Judah, J. D. and Rees, K. R.: Enzyme changes during liver autolysis. *J. Pathol. Bacteriol.* **72**, 242-256 (1956).
 33. White, R. R., Mela, L., Bacalzo, L., Olofsson, K. and Miller, L. D.: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage, and hypoxia: Emphasis on mitochondrial changes. *Surgery* **73**, 525-534 (1973).
 34. Greer, G. G., Epps, N. A. and Vail, W. J.: Interaction of lipopoly-saccharides with mitochondria. I. Quantitative assay of salmonella typhimurium lipopolysaccharides with isolated mitochondria. *J. Infect. Dis.* **127**, 551-556 (1973).
 35. Harris, R. A., Harris, D. L. and Green, D. E.: Effect of bordetella endotoxin upon mitochondrial respiration and energized processes. *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 219-230 (1968).
 36. Harken, A. H., Lillo, R. S. and Hufnagel, H. V.: Direct influence of endotoxin on cellular respiration. *Surg. Gynecol. Obstet.* **140**, 858-860 (1975).
 37. Depalma, R. G., Glickman, M. H., Hartman, P. and Robinson, A. V.: Prevention of endotoxin-induced changes in oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria. *Surgery* **82**, 68-73 (1977).
 38. Rangel, D. M., Byfield, J. E., Adomian, G. E., Stevens, G. H. and Fonkalsand, E. W.: Hepatic ultrastructural response to endotoxin shock. *Surgery* **68**, 503-511 (1970).
 39. Schumer, W., DasGupta, T. K., Moss, G. S. and Nyhus, L. M.: Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann. Surg.* **171**, 875-882 (1970).
 40. Ciznar, I. and Shands, J. W.: Effect of alkali-treated Lipopolysaccharide on erythrocyte membrane stability. *Infect. Immun.* **4**, 362-367 (1971).
 41. Shands, J. W.: Affinity of endotoxin for membranes. *J. Infect. Dis.* **128**, S 197-S 201 (1973).
 42. Rothfield, L. and Horne, R. W.: Reassociation of purified lipopolysaccharide and phospholipid of the bacterial cell envelope: electron microscopic and monolayer studies. *J. Bact.* **93**, 1705-1721 (1967).
 43. Willerson, J. T., Trelstad, R. L., Pincus, T., Levy, S. B. and Wolff, S. M.: Subcellular localization of salmonella enteritidis endotoxin in liver and spleen of mice and rats. *Infect. Immun.* **1**, 440-445 (1970).
 44. Mela, L., Bacalzo, L. V. and Miller, L. D.: Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am. J. Physiol.* **220**, 571-577 (1971).
 45. Chance, B. and Williams, G. R.: The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan. Enzymol.* **17**, 65-134 (1956).
 46. Boime, I., Smith, E. E. and Hunter, F. E.: Stability of oxidative phosphorylation and structural changes of mitochondria in ischemic rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 704-715 (1968).
 47. Mela, L., Miller, L. D., Diaco, J. F. and Surgerman, H. J.: Effect of *E. coli* endotoxin on mitochondrial energy linked functions. *Surgery* **68**, 541-549 (1970).
 48. Schumer, W., Erve, P., Kapica, S. K. and Moss, G. S.: Endotoxin effect on respiration of rat liver mitochondria. *J. Surg. Res.* **10**, 609-612 (1970).
 49. Lavine, L., Harano, Y. and Depalma, R. G.: ATPase activity and palmitate oxidation of hepatic mitochondria in energy production in en-

- dotoxemia. Surg. Forum **22**, 5-7 (1971).
50. Kagawa, Y. and Racher, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. x. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. J. Biol. Chem. **241**, 2475-2482 (1966).
51. Tapley, D. F.: The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. **222**, 325-339 (1956).
52. White, R. R., Mela, L., Miller, L. D. and Berwick, L.: Effect of *E. coli* endotoxin on mitochondrial form and function. Inability to complete succinate-induced condensed-to-orthodox conformational change. Ann. Surg. **174**, 983-990 (1971).
53. Gallagher, C. H.: Ageing mitochondria. Nature **187**, 162-164 (1960).
54. Hunter, F. E., Malison, R., Bridgers, W. F., Schutz, B. and Atchison, A.: Reincorporation of diphosphopyridine nucleotide into mitochondrial enzyme systems. J. Biol. Chem. **234**, 693-699 (1959).
55. Wojtczak, L. and Lehninger, A. L.: Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **51**, 442-456 (1961).
56. Lehninger, A. L. and Remmert, L. F.: An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. J. Biol. Chem. **234**, 2459-2464 (1959).
57. Utsumi, K., Ohara, S., Yamamoto, G., Inaba, K., Urakami, H. and Yamamoto, M.: Mitochondrial swelling and uncoupling activity of long-chain fatty acids. Acta. Med. Okayama **16**, 317-332 (1962).
58. Lillehei, R. C. and Maclean, L. D.: The intestinal factor in irreversible endotoxin shock. Ann. Surg. **148**, 513-525 (1958).
59. Lillehei, R. C., Longerbeam, J. K., Bloch, J. H. and Manax, W. G.: The nature of irreversible shock: Experimental and clinical observations. Ann. Surg. **160**, 682-710 (1964).
60. 江端俊彰: エンドトキシンの病態に関する研究—chemical mediator からみたアルドステロン, デキサメサゾンの効果—. 札幌医誌 **47**, 186-203 (1978).
61. Gilbert, R.: Mechanisms of the hemodynamic effects of endotoxin. Physiol. Rev. **40**, 245-279 (1960).
62. Ross, C. A.: Cardiovascular responses of unanesthetized rats during traumatic and endotoxin shock. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **96**, 582-587 (1957).
63. 平田公一, 金子愛子: エンドトキシン投与時におけるラット肝病変の研究. (II) リソソーム酵素活性ならびに形態学的変化からみた初期肝変化の解析. 札幌医誌 **47**, 374-390 (1978).
64. Mela, L., Miller, L. D., Bacalzo, L. V., Olofmon, K. and White, R. R.: Role of intracellular variations of lysosomal enzyme activity and oxygen tension in mitochondrial impairment in endotoxemia and hemorrhage in the rat. Ann. Surg. **178**, 727-735 (1973).